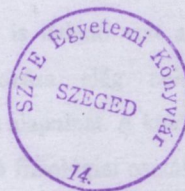


Egy különleges idegsejttípus az agykéregben:
a neurogliaform sejt

Ph.D. tézisek

Simon Anna



Témavezető:

Tamás Gábor, egyetemi docens

Összehasonlító Élettani Tanszék

Szegedi Tudományegyetem

2006

Szeged

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITÚZÉSEK

Az emlős agyban az agykéreg a sejt szerveződés legfejlettebb struktúrája. A kérgi sejtek két fő osztálya, a serkentő aminosavakat felszabadító piramissejtekből, és az ún. interneuronokból áll. A piramis sejtek glutaminsavat használnak ingerületátvivő anyagként (neurotranszmitter), hogy axonjaik révén serkentő bemeneteket adjanak a velük kapcsolatban álló azonos- és ellenoldali kéregterületeken, thalamuszban és a gerincvelőben elhelyezkedő sejtekre.

Ezzel ellentétben a kérgi idegsejtállomány mintegy egyötödét kitevő interneuronok γ -amino vajsavat (GABA) szabadítanak fel neurotranszmitterként (GABAerg interneuronok). Az interneuronok dendrit- és axonarborizációjukat tekintve nagyfokú morfológiai diverzitást mutatnak, ahogy az már a Golgi-festéssel készült metszeteken is látható volt a XIX. század végén. A GABAerg idegsejtek osztályozása elég nehézkes; morfológiai, hisztokémiai és fiziológiai jellemzőkön is alapulhat. A különböző tüzelési mintázatú GABAerg interneuronok különböző fiziológiai osztályokba sorolhatóak és ezek a csoportok jól megfeleltethetőek az egyes morfológiai csoportokkal. Az interneuronok az alapján is osztályozhatóak, hogy más idegsejtek mely területeire küldik neurotranszmitterjeiket; ennek megfelelően léteznek főként sejttestet kedvelő- (kosársejt), dendriteket kedvelő- (Martinotti sejt), vagy dendrittüskéket előnyben részesítő- (szabályosan tüzelő sejt), illetve az axon kezdeti szakaszát (axo-axonikus sejt) beidegző interneuronok. A sokféle interneuron típus – egymással is kölcsönhatásban – egyedi idegsejthálózatok része, amelyek az érzékelésben, valamint a tanulási, érzelmi, motivációs és mozgató jellegű agyműködésben összetett feladatokat hajtanak végre. A mai idegtudomány egyik nagy kérdése, hogy mi lehet a GABAerg interneuronok feladata ezekben a hálózatokban. A szinaptikusan aktív GABA elengedhetetlen a kérgi serkentő folyamatok operációs szinten tartásában és érzőkérgi neuronok receptív mező tulajdonságainak

meghatározásában. A GABAerg sejtek hatással vannak az akciós potenciálok keletkezésére és visszaterjedésére, a dendritikus kalcium elektrogenézisre és szerepet játszanak a populációs aktivitás szinkronizálásában. A GABA posztszinaptikus hatását -a posztszinaptikus membrán átmeneti hiperpolarizációját, illetve gátló posztszinaptikus potenciál (IPSP) generálását a posztszinaptikus sejtben - a kéregben két receptortípus közvetíti. A GABA_A receptorok gyors aktivációjú klorid-csatornák, a GABA_B receptorok pedig kálium konduktanciát aktiválnak egy lassúbb, G-protein közvetítette folyamatban. Általánosan elfogadott, hogy a sejtest közelében főként GABA_A receptorok aktiválódnak, míg a dendriteken iontoforetikusan alkalmazott GABA multifázisos választ vált ki.

A kloridcsatornák közvetítette gyors agykérgi gátlást létrehozó GABAerg sejtek közismertek, azonban eddig még nem sikerült olyan agykérgi GABAerg sejtet azonosítani, amely megbízhatóan aktiválna GABA_B receptort. Ezért kerestünk olyan agykérgi interneuront, amely képes kiváltani GABA_A és GABA_B receptorok által közvetített komplex posztszinaptikus hatást. A kitarató munka eredményeként kerültünk szembe a neurogliaform sejtrel, amely a GABAerg interneuronok családjának különös tagja. Ezen project során a neurogliaform sejtek rekonstruálása, dendritfájuk, és axonfelhőjük morfológiájának pontos leírása, illetve a kémiai kapcsolataik (szinapszisok) helyének térképezése volt feladatom.

A kémiai szinapszisok mellett az idegrendszerben fontos szerepet játszanak az elektromos szinapszisok is. Az elektromos szinapszisok nem receptorokon, hanem rés kapcsolatokon, vagyis un. gap junction-ön keresztül közvetítik a gátló, vagy serkentő potenciálokat. A rés kapcsolatot alkotó connexin fehérjék (2x6db) 1- 1,5 nm-es átmérőjű csatornácskáival direkt kapcsolatot teremtenek két szomszédos sejt között.

A rés kapcsolatokban a két párhuzamosan futó szomszédos sejthártya közötti távolság 2-3 nm. Ezeken a kapcsolatokon keresztül lehetséges a késedelem nélküli potenciáltovábbítás, ami a sejtek, sejthálózatok egyidejű szinkron működését nagymértékben meghatározza. Felnőtt agykéregben kimutattak elektromos szinapszisokat GABAerg interneuronok között, amelyek hozzájárulnak az így kapcsolt sejtek szinkron működéséhez. Kosársejtek homogén, réskapcsolatokkal összefűzött hálózata a γ -ritmus létrehozásában és fenntartásában játszik szerepet, a dendritcélzó sejtek réskapcsolat-hálózatában β - és a γ -ritmus alakulhat ki, a multipoláris bórsztölő sejtek hálózatában az elektromos kapcsolatok a θ -ritmus kialakulását segítik. Az agykérgi interneuronok rés-kapcsolat hálózatainak egyik általánosan megfigyelt tulajdonsága az, hogy általában azonos típusú sejtek alakítanak ki ilyen elektromos kapcsolatot egymás között. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az elektromos szinapszisokon keresztüli szinkronizáció csak a homogén interneuron populációkra jellemző. Vannak arra utaló eredmények, hogy neurogliaform-szerű sejtek között elektromos kapcsolatok lehetnek, azonban ennek anatómiai hátterének leírása és a sejttípusok pontos azonosítása még nem történt meg. Ezért választottam feladatul a neurogliaform sejtek elektromos kapcsolatainak és a hozzá elektromosan kapcsolt interneuron típusoknak az anatómiai azonosítását.

MÓDSZEREK

A kísérlethez fiatal (18-25 napos) Wistar patkányokat használtunk. Az állatokat intraperitoneális ketamin (30 mg/kg) és xilazin (10 mg/kg) anesztézia alatt dekapitáltuk, az agy kipreparálását hűtött Mesterséges CerebroSpinális Folyadékban végeztük (MCSF), melynek összetétele a következő volt: 130 mM NaCl; 3,5mM KCl, 1 mM NaHPO₄; 24mM NaHCO₃; 1mM CaCl₂; 3mM MgSO₄; 10 mM D(+) glükóz. A CaCl₂ hozzáadása előtt 10-20 percig jégen karbogénnel (95% O₂, 5% CO₂) oxigenáltuk, hogy elkerüljük a CaCO₃ kicsapódását. Leica VT 1000S metszőkészülékkel 320 µm vastag koronális metszeteket készítettünk a szomatoszenzoros kéregből. A szeleteket 1 órán át inkubáltuk 30 °C-os oxigenált MCSF-ben. Az elektrofiziológiai vizsgálatokhoz a szeleteket 37 °C-os elvezető kamrába helyeztük, amelyen mesterséges cerebrospinális folyadékot áramoltattunk át, ez a preparálás során alkalmazottól eltérően 3mM CaCl₂-ot és 1,5 mM MgSO₄-ot tartalmazott.

Az elektrofiziológiai kísérletek alapját a whole cell patch clamp technikával végzett páros, illetve triplet elvezetések képezték II/III rétegbeli neuronokból. A sejteket alakjuk (multipoláris, bipoláris) szerint választottuk ki infravörös DIC (differenciál interferencia kontraszt) videomikroszkópia (Zeiss Axioskop FS mikroszkóp, Hamamatsu CCD kamera, Luigis & Neumann Infrapatch manipulátor rendszer) segítségével. A mikropipettákat (5-7 MOhm) intracelluláris oldattal töltöttük meg (pH 7.25, 300mOsm): 126 mM K-glükonát, 4 mM KCl, 4mM ATP-Mg, 0,3mM GTP-NA₂, 10mM HEPES, 10mM keratin-foszfát és a sejtek töltéséhez 8mM biocytin (N-biotinilált lizin). A GABAerg neuronok további azonosítása fiziológiai jellemzők alapján történt. Az esetek többségében a diffúzió megfelelő töltést eredményezett a neuronokban. A szeleteket fixáltuk, majd továbbmetszettük 60 µm-es metszetekre

és a biocitinnel töltött sejteket avidin-biotinilált tormaperoxidáz módszerrel tettük láthatóvá, diaminobenzidint alkalmazva kromogénként. A metszeteket utólagosan OsO_4 -ban rögzítettük, majd uranil-acetátban festettük, víztelenítettük és tárgylemezeken epoxigyantába ágyztuk.

A biocitinnel töltött, azonosított sejtpárok, illetve tripletek háromdimenziós rekonstrukciója a Neurolucida rendszer és BX-60F fénymikroszkóp segítségével készült. A feltételezett szinapszisok posztzinaptikus szómától való távolságát Neuroexplorer programmal mértük. A mért értékek alapján dendrogramot készítettünk. Az interneuronok adatait szintén a Neuroexplorer program algoritmusainak segítségével gyűjtöttük ki numerikus-, szegmens- és Sholl analízist végezve. A sejtek statisztikai analizéséhez parametrikus és nem-parametrikus próbákat végeztünk az SPSS 11.0, és az ORIGIN 6.0 programok segítségével. A különbségeket akkor tekintettük szignifikánsnak, ha $p < 0,05$ volt.

A fénymikroszkópos analízist követően a jelölt sejtek területét átágyztuk ultravékony metszetek készítésére. Az ultramikrotómmal készített 65 nm-es sorozatmetszeteket hártásított egylyukú réz gridekre emeltük és ólomcitráttal festettük. A fénymikroszkóposan becsült szinapszisok korrelált elektronmikroszkópos azonosítását TECHNAI Philips elektronmikroszkóp segítségével végeztük.

EREDMÉNYEK ÉS TÁRGYALÁS

A neurogliaform sejt-piramissejt kapcsolat fiziológiája, a lassú agykérgi gátlás anatómiai háttere

Bizonyos páros whole cell elvezetésekben a párok tagjai között munkatársaim lassú kérgi IPSP-k kialakulására lettek figyelmesek (10 – 90 %

felfutási idő: 23.6 ± 10.5 ms, félszélesség: 183.9 ± 82.5 ms). Ezen kapcsolat tesztelésére egyes pulzus és páros pulzus kísérleteket végeztek. Egyes pulzus kísérletben a preszinaptikus sejtben kiváltott akciós potenciál a posztszinaptikus sejtben 23.4 ± 9.8 ms felfutási idejű és 183.9 ± 82.5 ms félszélességű IPSP-t váltott ki. A páros pulzus kísérletekben a preszinaptikus sejtben kiváltott akciós potenciál a piramissejtben tartós gátlást idéz elő. A második akciós potenciál hatására membránpotenciálja még messzebb kerül az alapvonaltól és csak 4-500 ms múlva regenerálódik újra. Kimutatásra került továbbá, hogy a lassú gátlás farmakológiailag két komponensre bontható, egy gyors, bikukullin érzékeny, $GABA_A$ receptor közvetítette és egy ezt követő lassú, CGP érzékeny $GABA_B$ receptor mediálta összetevőre. Ez az ún. tartós kérgi gátlás, melynek anatómiai hátterét ezideig nem sikerült azonosítani.

A fenti piramissejteknél kiváltott IPSP-k anatómiai háttereként minden esetben neurogliaform sejtet határoztam meg. A neurogliaform sejteket elsőként Ramon Y Cajal írta le 1899-ben, *cellule neurogliaforme* néven, a gliasejttel való hasonlatosságuk miatt. Szinonim névként használta még a törpesejt és pókháló sejt kifejezéseket. A neurogliaform sejtestje viszonylag kicsi, kerekded, dendritjei rövidek, gyöngyöztek. Fénymikroszkópos megfigyelésem szerint a neurogliaform sejtek 7-9 fődendritje gömbszerű dendritfát alakít ki. Más interneuronokkal való morfológiai összehasonlítása alapján azt mondhatjuk, hogy a neurogliaform sejteket dendritfájuk Sholl analízise alapján különböztethetjük meg legbiztonságosabban. A dendritfák kompakt kiterjedése arra enged következtetni, hogy a neurogliaform sejtek térben szelektív bemenetet kapnak mind az intrakortikális és felszálló glutamáterg afferensektől, mind a döntően helyi GABAerg forrásoktól.

A 3D fénymikroszkópos rekonstrukciók szerint a neurogliaform sejtek axonja kompakt, vékony kollaterálisai sűrűn betöltik a sejtest körüli teret. Az általuk alkotott szinapszisok térszelektíven innerválják a posztszinaptikus piramissejt sejt felszínét, főként a dendrittüskékre és

dendrittörzsekre adva le szinapszisaikat. A dendrittüskéket és különösen a tüskék alapját célzó GABAerg szinapsziszok szintén fontosak lehetnek a dendrittüskék fejére érkező serkentő bemenetek kontrolljában. A gátló kloridkonduktancia ($GABA_A$) a tüskealapon különösen hatékony söntölő hatású, míg a tüskére érkező gátló káliumkonduktancia ($GABA_B$) nagyon erősen csökkentheti a serkentő posztszinaptikus potenciálok hatását hiperpolarizáló gátlás útján. Ezért még egy viszonylag kis amplitúdójú bemenetnek is jelentős hatása lehet a posztszinaptikus sejt akciós potenciáljának időzítésében, ha térben és időben rendezetten érkezik.

A neurogliaform sejt axonjának részletesebb elemzése

A neurogliaform sejt axonja bárhol eredhet és rendkívül sűrű, gömb formájú axonfelhőt formálva nagyrészt abban a sejtrétegben helyezkedik el, ahol a sejttest, csak kis mértékben nyúlik át más rétegekbe. A főaxon a harmadik - negyedik elágazás után rendszerint csokorszerűen szétbomlik, és vékony ágaival behálózza a sejttest környékét, rendkívül sűrű, gömb formájú axonfelhőt képezve: $0.954 \pm 0.299 \mu\text{m}$ axon $1000 \mu\text{m}^3$ -ben ($p < 0,006$). Összehasonlításképpen más GABAerg interneuronok axonjának sűrűsége: 0.453 ± 0.015 axon $1000 \mu\text{m}^3$ -ben. Az axon megjelenése egyértelműen meghatározza a sejt anatómiáját; vékony, apró kis boutonokkal borított, de ezen boutonok a más típusú GABAerg sejtek dendritjeivel eddigi megfigyeléseink szerint ($n=19$) nem képeznek „klasszikusnak” mondható kémiai szinapszist. Az axonról készített elektronmikroszkópos 3D rekonstrukciók alapján az axonon sűrűn elhelyezkedő *en passant* boutonok átmérője 400-800 nm közöttinek adódott, illetve ezen boutonok 3-8 μm -ként követik egymást az axonkollaterálisok mentén.

A neurogliaform sejtek közötti elektromos kapcsolat

A fentebb jellemzett, komplex GABA_A + GABA_B választ kiváltó neurogliaform sejtekről kimutattuk, hogy képesek egymással elektromos szinapszison keresztül kommunikálni. Patkány szomatoszenzoros agykéregben végzett páros, illetve triplet elvezetéseink azt is bizonyítják, hogy a neurogliaform sejtek egyedülálló módon más típusú GABAerg interneuronokkal is létesítenek elektromos kapcsolatot, mint például gyorsan tüzelő kosársejtekkel, szabályosan tüzelő sejtekkel, Martinotti sejtekkel és axo-axonikus sejtekkel is. A kapcsolatok elektrofiziológiai tesztelése depolarizáló, illetve hiperpolarizáló impulzussal történt. Az elektromos kapcsolat anatómiai hátterét, vagyis a gap junctiont, korrelált elektronmikroszkópiával mutattam ki. Az elektromos jelek esetenként egy, vagy két rés kapcsolaton keresztül közlekedtek, amelyek a sejttesten, vagy a dendriten helyezkedtek el. Kísérleteink alapján a neurogliaform sejt – neurogliaform sejt elektromos kapcsolat jóval gyakoribb volt (50%), mint a neurogliaform sejt – más típusú GABAerg interneuron közötti elektromos kapcsolat (~20%). A rés kapcsolatok ultrastruktúrájának feltárásából arra következtethetünk, hogy az elektromosan összefűzött interneuronok citoplazmikusan nem összefüggőek. Ezt a feltételezést támasztják alá azok a megfigyelések is, miszerint a dye coupling jelenség hiányzik az egymással rés kapcsolatban álló agykérgi idegsejtek között. A dye coupling hiánya kísérleteinkben a homológ és heterológ gap junction-nal felfűzött sejtek között, a rés kapcsolatok hasonlóságára, illetve a connexin 36 csatornafehérje részvételére utal.

Laborunk előzetes homológ rés kapcsolatokkal foglalkozó tanulmányaiban a kapcsolatok minden esetben a szómák és/vagy dendritek között helyezkedtek el, de a hippocampusban a piramissejtek között is meglévő axo-axonális rés kapcsolatok azt sugallják, hogy az elektromos kapcsolatok kialakulása az idegsejtek meghatározott helyeihez köthetők. Az itt

bemutatott heterológ elektromos kapcsolatokat is sejttest és dendrit, illetve dendrit és dendrit között találtuk meg, ez alapján úgy tűnik, hogy az idegsejtek meghatározott helyeihez köthetők. Az itt bemutatott heterológ elektromos kapcsolatokat is sejttest és dendrit, illetve dendrit és dendrit között találtuk meg, ez alapján úgy tűnik, hogy az agykérgi interneuronok dendritfáik kapcsolódása révén alkotnak elektromosan összekapcsolt hálózatot.

Az a tény, hogy a neurogliaform sejtek más interneuronokkal nagy valószínűséggel állhatnak elektromos kapcsolatban, különleges szerepet jósol e sejttípusnak. Mivel az elektromos szinapszisokat érintő kérgi fejlődés a vizsgált állatokban a harmadik hét végére lezárul, ezért a fiatal felnőtt elektromos szinapszisok képzése nem tekinthető átmeneti, a fejlődés részét képező, idővel eltűnő jelenségnek. Eredményeink azt mutatják, hogy a neurogliaform sejtek nagyon ritkán kapcsolódnak egymáshoz tisztán elektromos szinapszissal, túlnyomórészt az elektromos szinapszis mellett még reciprok módon gátolják egymást lassú IPSP-vel. Az összetett kémiai és elektromos kapcsolat elég hatásos módja a szinkronizációnak, ezért gyanítható, hogy a neurogliaform sejtek esetében is elősegíti a két sejt szinkron működését ez a mechanizmus.

Eredményeink szerint a neurogliaform sejtek tehát egyedülálló módon, elektromos és kémiai szinapszisokkal innerválják a különböző interneuron populációkat a felnőtt agykéregben. Így hozzájárulhatnak a kérgi szinkron aktivitás kialakulásához lassú IPSP-kból álló szinkron bemeneteik segítségével, másrészt a különböző interneuronok aktivitásának monitorozásával e szinkron gátlást egyedülállóan tudják hangolni a teljes GABAerg hálózat pillanatnyi állapotához.

KÖZLEMÉNYEK

Gábor Tamás, Andrea Lőrincz, Anna Simon, János Szabadics (2003):
Identified sources and targets of slow inhibition in the neocortex. *Science*,
Vol. 299, pp. 1902-1905

Anna Simon, Szabolcs Oláh, Gábor Molnár, János Szabadics, Gábor Tamás
(2005): Gap junctional coupling between neurogliaform cells and various
interneuron types in the neocortex. *Journal of Neuroscience*, Volume 25
(27): 6278-6285.

KONFERENCIA POSZTEREK

Gábor Tamás, Andrea Lőrincz, Anna Simon, János Szabadics (2003):
Identified sources of slow inhibition in the neocortex. 6th IBRO
Conference, Prága,

Gábor Tamás, Andrea Lőrincz, Anna Simon, János Szabadics (2004):
Identified sources of slow inhibition in the neocortex. IBRO International
Workshop - Budapest

Anna Simon, Szabolcs Oláh, Gábor Molnár, János Szabadics, Gábor Tamás
(2004): Gap junctional coupling between neurogliaform cells. 3rd
Inmed/TINS Conference: The multiple facets of GABAergic synapses, La
Ciotat, Franciaország,

Anna Simon, Szabolcs Oláh, Gábor Molnár, János Szabadics, Gábor Tamás
(2005): Gap junctional coupling between neurogliaform cells and various
interneuron types in the neocortex. MITT XI. Konferencia, Pécs,

- Szabolcs Oláh, János Szabadics, Anna Simon, Gábor Molnár, Csaba Varga, Gábor Tamás (2006): Connection specific output of neurogliaform cells in the cerebral cortex. IBRO International Workshop - MITT XI. Konferencia, Budapest
- Gergő Komlósi, Gábor Molnár, Szabolcs Oláh, Anna Simon, János Szabadics, Csaba Varga, Pál Barzó, Gábor Tamás (2006): Chemical and electrical connections between identified neurons in the human cerebral cortex. IBRO International Workshop - MITT XI. Konferencia, Budapest